

(19)日本国特許庁（J P）

(12) 特 許 公 報 （B 2）

(11)特許番号

特許第3267933号  
(P3267933)

(45)発行日 平成14年 3 月25日 (2002. 3. 25)

(24)登録日 平成14年 1 月11日 (2002. 1. 11)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

G 0 1 N 27/327

G 0 1 N 27/30

3 5 3 R

27/416

27/46

3 3 6 B

請求項の数 5 (全 8 頁)

(21)出願番号 特願平10-172766

(22)出願日 平成10年 6 月19日 (1998. 6. 19)

(65)公開番号 特開平11-344462

(43)公開日 平成11年12月14日 (1999. 12. 14)

審査請求日 平成12年11月16日 (2000. 11. 16)

(31)優先権主張番号 特願平10-13957

(32)優先日 平成10年 1 月27日 (1998. 1. 27)

(33)優先権主張国 日本（J P）

(31)優先権主張番号 特願平10-89740

(32)優先日 平成10年 4 月 2 日 (1998. 4. 2)

(33)優先権主張国 日本（J P）

(73)特許権者 000005821

松下電器産業株式会社

大阪府門真市大字門真1006番地

(72)発明者 池田 信

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電  
器産業株式会社内

(72)発明者 吉岡 俊彦

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電  
器産業株式会社内

(72)発明者 南海 史朗

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電  
器産業株式会社内

(74)代理人 100072431

弁理士 石井 和郎

審査官 黒田 浩一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 基質の定量法

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】 電気絶縁性基板と、前記基板上に形成された作用極、対極、および、妨害物質検知電極として使用される第3の電極とを有する電極系と、前記第3の電極を除く前記電極系上に設けられた、少なくとも酸化還元酵素と電子伝達体を含む反応層と、前記基板との間に試料液供給路を形成するカバー部材とからなり、前記第3の電極が前記反応層よりも前記試料液供給路の上流側に配置されており、かつ前記作用極が前記対極よりも前記試料液供給路の上流側に配置されていることを特徴とするバイオセンサ。

【請求項 2】 前記カバー部材の試料液供給路に露出した面に、レシチンを主成分とする層を配置したことを特徴とする、請求項 1 記載のバイオセンサ。

【請求項 3】 前記反応層が、さらに親水性高分子を含

2

有することを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載のバイオセンサ。

【請求項 4】 電気絶縁性基板と、前記基板上に形成された作用極、対極、および、妨害物質検知電極として使用される第3の電極とを有する電極系と、第3の電極を除く電極系上に設けられた、少なくとも酸化還元酵素と電子伝達体を含む反応層と、前記基板との間に試料液供給路を形成するカバー部材とからなり、前記第3の電極が前記反応層よりも前記試料液供給路の上流側に配置されており、かつ前記作用極が前記対極よりも前記試料液供給路の上流側に配置されているバイオセンサを用いて、試料液に含まれる基質と酸化還元酵素とを反応させる際に生成する電子によって電子伝達体を還元し、その電子伝達体の還元量を電気化学的に計測することにより、試料液中の基質の濃度を定量する方法であって、

対極と第 3 の電極との間に電圧を印加する工程、  
 試料液を反応層に供給する工程、  
 試料液の反応層への供給によって生じた、対極と第 3 の電極との間の電気的変化を検知する工程、  
 前記の検知する工程の後、対極と第 3 の電極との間に生じた電流を測定する工程、  
 前記の測定する工程の後、対極と第 3 の電極との間の電圧印加を解除する工程、  
 作用極と対極との間に電圧を印加する工程、およびその後、対極と作用極との間に生じた電流を測定する工程、  
 を包含することを特徴とする基質の定量法。

【請求項 5】 電気絶縁性基板と、基板上に形成された作用極、対極、および、妨害物質検知電極あるいは参照極として使用される第 3 の電極とを有する電極系と、第 3 の電極を除く電極系上に設けられた、少なくとも酸化還元酵素と電子伝達体を含む反応層と、前記基板との間に試料液供給路を形成するカバー部材とからなり、前記第 3 の電極が前記反応層よりも前記試料液供給路の上流側に配置されており、かつ前記作用極が前記対極よりも前記試料液供給路の上流側に配置されているバイオセンサを用いて、試料液に含まれる基質と酸化還元酵素とを反応させる際に生成する電子によって電子伝達体を還元し、その電子伝達体の還元量を電気化学的に計測することにより、試料液中の基質の濃度を定量する方法であって、

対極と第 3 の電極との間に電圧を印加する工程、  
試料液を反応層に供給する工程、  
試料液の反応層への供給によって生じた、対極と第 3 の電極との間の電気的変化を検知する工程、  
前記の検知する工程の後、対極と第 3 の電極との間に生じた電流を測定する工程、  
前記の測定する工程の後、対極と第 3 の電極との間の電圧印加を解除する工程、  
作用極と第 3 の電極および対極との間に電圧を印加する工程、およびその後、対極と作用極との間に生じた電流を測定する工程、  
を包含することを特徴とする基質の定量法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、試料中の基質について、迅速かつ高精度な定量を簡便に実施するための定量法に関する。

【0002】

【従来の技術】スクロース、グルコースなど糖類の定量分析法として、施光度計法、比色法、還元滴定法、各種クロマトグラフィーを用いた方法等が開発されている。しかし、これらの方法はいずれも、糖類に対する特異性があまり高くないので精度が悪い。これらの方法のうち施光度計法によれば、操作は簡便ではあるが、操作時の温度の影響を大きく受ける。従って、施光度計法は、一

般の人々が家庭などで簡易に糖類を定量する方法としては適切でない。ところで、近年、酵素の有する特異的触媒作用を利用した種々のタイプのバイオセンサが開発されている。以下に、試料液中の基質の定量法の一例としてグルコースの定量法について説明する。電気化学的なグルコースの定量法としては、グルコースオキシダーゼ（EC 1. 1. 3. 4：以下 GOD と略す）と酸素電極あるいは過酸化水素電極とを使用して行う方法が一般に知られている（例えば、鈴木周一編「バイオセンサー」講談社）。

【0003】GOD は、酸素を電子伝達体として、基質である  $\beta$ -D-グルコースを D-グルコノ- $\delta$ -ラク톤に選択的に酸化する。酸素の存在下で、GOD による酸化反応過程において、酸素が過酸化水素に還元される。酸素電極によって、この酸素の減少量を計測するか、あるいは過酸化水素電極によって過酸化水素の増加量を計る。酸素の減少量および過酸化水素の増加量は、試料液中のグルコースの含有量に比例するので、酸素の減少量または過酸化水素の増加量からグルコースを定量することができる。この方法は、その反応過程からも推測できるように、測定結果は試料液に含まれる酸素濃度の影響を大きく受ける欠点がある。また、試料液に酸素が存在しない場合は測定が不可能となる。

【0004】そこで、酸素を電子伝達体として用いず、フェリシアン化カリウム、フェロセン誘導体、キノン誘導体等の有機化合物や金属錯体を電子伝達体として用いる新しいタイプのグルコースセンサが開発されてきた。このタイプのセンサでは、酵素反応の結果生じた電子伝達体の還元体を電極上で酸化することにより、その酸化電流量から試料液中に含まれるグルコース濃度が求められる。このような有機化合物や金属錯体を酸素の代わりに電子伝達体として用いることで、既知量の GOD とそれらの電子伝達体を安定な状態で正確に電極上に担持させて反応層を形成することが可能となる。この場合、反応層を乾燥状態に近い状態で電極系と一体化させることもできるので、この技術に基づいた使い捨て型のグルコースセンサが近年多くの注目を集めている。使い捨て型のグルコースセンサにおいては、測定器に着脱可能に接続されたセンサに試料液を導入するだけで容易にグルコース濃度を測定器で測定することができる。このような手法は、グルコースの定量だけに限らず、試料液中に含まれる他の基質の定量にも応用可能である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】上記の様なセンサを用いた測定によると、還元型電子伝達体を作用極上にて酸化し、その際に流れる酸化電流値に基づいて基質濃度が求められる。しかしながら、血液や果汁等が試料として用いられた場合、その試料中に含まれるアスコルビン酸、尿酸等の易酸化性物質も、還元型電子伝達体と同時に作用極上で酸化される。この易酸化性物質の酸化反応

10

20

30

40

50



が、測定結果に影響を与える場合がある。

【0006】また、上記のようなセンサを用いた測定では、反応層に担持された電子伝達体が還元されると同時に、溶存酸素を電子伝達体として過酸化水素を生成する反応が進行する。さらに、この反応にて生成した過酸化水素は、還元型電子伝達体を再酸化する。結果として、還元型電子伝達体の酸化電流に基づいて基質濃度を測定する場合、溶存酸素が測定結果に負の誤差を与える場合がある。

【0007】上記の方法においては、電流応答を得るために作用極と対極との間に電圧を印加する以前に、作用極と対極との間に電圧を印加し、その両極間の電気的変化に基づいて液絡検知を行う場合が多い。その際に、試料液が十分量電極系に供給される前に、前記作用極－対極間の抵抗値が変化して測定が始まる場合があり、測定結果に影響を与える場合があった。また、作用極の界面状態に変化を来し、測定結果に影響を与える場合があった。さらに、二電極式による測定方法においては、対極を参照極として併用する。このため、基準となる対極電位が作用極での酸化還元反応に伴い変動するから、これによって測定結果に影響が与えられることがあった。

【0008】本発明は、以上のような不都合をなくし、易酸化性物質による影響を除去し、正確な基質濃度を測定できる定量法を提供することを目的とする。本発明は、また応答のばらつきがより減少された基質の定量法を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決するために本発明は、電気絶縁性基板と、前記基板上に形成された作用極、対極、および、妨害物質検知電極として使用される第3の電極とを有する電極系と、前記第3の電極を除く前記電極系上に設けられた、少なくとも酸化還元酵素と電子伝達体を含有する反応層と、前記基板との間に試料液供給路を形成するカバー部材とからなり、前記第3の電極が前記反応層よりも前記試料液供給路の上流側に配置されており、かつ前記作用極が前記対極よりも前記試料液供給路の上流側に配置されていることを特徴とするバイオセンサを提供する。

【0010】本発明は、また、電気絶縁性基板と、前記基板上に形成された作用極、対極、および、妨害物質検知電極として使用される第3の電極とを有する電極系と、第3の電極を除く電極系上に設けられた、少なくとも酸化還元酵素と電子伝達体を含有する反応層と、前記基板との間に試料液供給路を形成するカバー部材とからなり、前記第3の電極が前記反応層よりも前記試料液供給路の上流側に配置されており、かつ前記作用極が前記対極よりも前記試料液供給路の上流側に配置されているバイオセンサを用いて、試料液に含まれる基質と酸化還元酵素とを反応させる際に生成する電子によって電子伝達体を還元し、その電子伝達体の還元量を電気化学的に

計測することにより、試料液中の基質の濃度を定量する方法であって、以下の工程を包含する定量法を提供する。

- (1) 対極と第3の電極との間に電圧を印加する工程、
- (2) 試料液を反応層に供給する工程、
- (3) 試料液の反応層への供給によって生じた、対極と第3の電極との間の電気的変化を検知する工程、
- (4) 前記の検知する工程(3)の後、対極と第3の電極との間に生じた電流を測定する工程、
- (5) 前記の測定する工程(4)の後、対極と第3の電極との間の電圧印加を解除する工程、
- (6) 作用極と対極との間に電圧を印加する工程、および
- (7) その後、対極と作用極との間に生じた電流を測定する工程。

【0011】本発明の定量法においては、第3の電極を参照極として用いることが好ましい。すなわち、上記の工程(6)において、作用極と第3の電極との間にも電圧を印加する。また、前記基板にカバー部材を組み合わせたバイオセンサを用いる場合は、試料液供給路に露出したカバー部材の壁面に、レシチンを担持する層を配置することが好ましい。さらに、前記反応層は、親水性高分子を含有することが好ましい。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明の定量法に用いられるバイオセンサの構成を説明する。まず、第1のタイプのバイオセンサを図1により説明する。このセンサは、ポリエチレンテレフタレートなどからなる絶縁性の基板1上に、対極6、作用極7、および第3の電極8が設けられ、さらにこれらに電気接続されたリード2、3、4が各々設けられている。カーボン層9は、反応層の作製を容易にするために設けられた層であり、電極としては機能しない。第3の電極8を除く、対極6、作用極7およびカーボン層9上に、酸化還元酵素と電子伝達体を含む円形の反応層(図示しない)が設けられている。図中、5は絶縁層である。

【0013】次に、第2のタイプのバイオセンサを図2により説明する。このセンサは、図1の基板1に、カバー10およびスペーサ11からなるカバー部材を組み合わせたものである。これらは、図2中に一点鎖線で示すような位置関係をもって接着されてセンサが構成される。スペーサ11には試料液供給路を形成するスリット12が形成され、また、カバー10には空気孔13が形成されている。基板1上にスペーサ11を介してカバー10を積層し接着すると、基板1、スペーサ11およびカバー10によって試料液供給路となる空間部がスペーサ11のスリット12の部分に形成される。この空間部の終端部は、空気孔13に連通する。このバイオセンサにおいては、作用極7は、半月状の対極6よりも試料液供給口12a(スリット12の解放端部に相当する)に近

7

い位置に配置され、第3の電極8は、作用極7よりさらに試料液供給口12aに近い位置に配置されている。これらの電極6、7、および8は、それぞれ上記空間部に露出している。

【0014】上記のバイオセンサを用いて基質濃度を測定するには、まずセンサのリード2、3および4を有する側の端部を測定器にセットし、対極6を基準にして第3の電極8に所定の電位を印加する。この電位を印加した状態で、妨害物質として例えばアスコルビン酸を含む試料液反応層上に滴下し、反応層を試料液に溶解させる。試料液の供給と同時に、電極系の対極6と第3の電極8間の電気的変化に基づいて液の供給を検知するシステムが動作し、これによって測定タイマーが始動する。この時、対極6と第3の電極8間には、電位は印加され続けており、試料液が供給されたことを検知してから一定時間経過後に、対極6と第3の電極8間の電流値を測定する。第3の電極8上には反応層が配置されていないから、酵素反応の結果生成した電子伝達体の還元体が第3の電極8近傍に到達するまでには、若干の時間を必要とする。従って、前記の電流値は、妨害物質として含まれるアスコルビン酸の酸化反応に起因する。

【0015】次に、対極6と第3の電極8間の電圧印加を解除する。その後、対極6を基準にして作用極7に、前記電子伝達体の還元体を酸化する電位を印加し、対極6と作用極7間の電流値を測定する。この電流は、電子伝達体の還元体と、あらかじめ存在する妨害物質アスコルビン酸の酸化反応に起因する。すなわち、アスコルビン酸が測定結果に正の誤差を与えることとなる。そして、上述の対極6と第3の電極8間の電流値は主にアスコルビン酸の濃度のみを反映しているから、この電流値に基づき測定結果を補正することにより、アスコルビン酸の影響を除去し、正確な基質濃度を求めることができる。第2のタイプのセンサでは、対極6と第3の電極8間で試料液の供給を検知するため、作用極7の露出部全てが確実に試料液で満たされる。これにより、試料液の供給をより確実に判定することができる。

【0016】

【実施例】以下、本発明を実施例により詳細に説明する。

《実施例1》グルコースの定量法を説明する。グルコースセンサの基板には図1に示すものを使用した。このグルコースセンサは以下のようにして作製した。ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板1上に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷しリード2、3、および4を各々形成した。次に、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを基板1上に印刷して作用極7および第3の電極8を形成した。作用極7および第3の電極8は、各々リード3および4と電氣的に接触している。次にその基板1上に、絶縁性ペーストを印刷して絶縁層5を形成した。絶縁層5は、作用極7および第3の

8

電極8の外周部を覆っており、これによって作用極5および第3の電極8の露出部分の面積は一定に保たれる。絶縁層5は、リード2、3、および4の一部を覆っている。

【0017】次に、第3の電極8を除く、対極6、作用極7およびカーボン層9上にカルボキシメチルセルロース（以下CMCと略称する）の水溶液を滴下し、乾燥させることにより、CMC層を形成した。このCMC層上に、酵素としてGOD、および電子伝達体としてフェリシアン化カリウムを含む水溶液を滴下すると、親水性高分子からなるCMC層は一度溶解し、その後の乾燥過程で酵素などと混合された形で反応層を形成する。しかし、攪拌等を伴わないため完全な混合状態とはならず、電極系表面はCMCのみによって被覆された状態となる。すなわち、酵素および電子伝達体などが電極系表面に接触しないために、電極系表面へのタンパク質の吸着などを防ぐことができる。

【0018】このセンサを用いてグルコース濃度を測定するために、まずリード2、3および4を有する側の端部を測定器にセットし、対極6を基準にして第3の電極8に500mVの電位を印加した。この電位を印加した状態で、妨害物質としてアスコルビン酸を含むグルコース水溶液30 $\mu$ lを、試料液として反応層上に滴下した。電極系上の反応層は、滴下された試料液に溶解した。試料液の供給と同時に、電極系の対極6と第3の電極8間の電気的変化に基づいて液の供給を検知するシステムが動作する。これによって測定タイマーが始動した。この時、対極6と第3の電極8間には、電位は印加され続けており、試料液が供給されたことを検知してから一定時間経過後に、対極6と第3の電極8間の電流値を測定した。この電流値は、妨害物質として含まれるアスコルビン酸の酸化反応に起因し、その濃度に対して比例関係を与えた。対極6と第3の電極8間の電流値測定後、両極間の電圧印加を解除した。

【0019】上述したように、第3の電極8上には反応層が配置されていない。よって、酵素反応の結果生成したフェロシアン化イオンが第3の電極8近傍に到達するまでには、若干の時間を必要とする。すなわち、フェロシアン化イオン到達までの時間内における対極6と第3の電極8間の電流値は、主にアスコルビン酸の濃度のみを反映する。さらに、試料液検知から25秒後、対極6を基準にして作用極7に500mVを印加し、対極6と作用極7間の5秒後の電流値を測定した。液中のフェリシアン化イオン、グルコース、およびGODが反応し、その結果、グルコースがグルコノラクトンに酸化され、フェリシアン化イオンがフェロシアン化イオンに還元される。このフェロシアン化イオンの濃度は、グルコースの濃度に比例する。試料液検知から30秒後の対極6と作用極7間の電流は、フェロシアン化イオンと、あらかじめ存在するアスコルビン酸の酸化反応に起因する。す



なわち、アスコルビン酸が測定結果に正の誤差を与えることとなる。しかしながら、上述したように、対極6と第3の電極8間の電流値は主にアスコルビン酸の濃度のみを反映する。そこで、その結果に基づき測定結果を補正することにより、アスコルビン酸の影響を除去し、正確なグルコース濃度を求めることができる。

【0020】《実施例2》実施例1と同様に、基板1上に電極6、7、8、およびカーボン層9を形成した。次に、第3の電極8を除く、対極6、作用極7およびカーボン層9上にCMC水溶液を滴下し、乾燥させることにより、CMC層を形成し、このCMC層上に、酵素としてGOD、および電子伝達体としてフェリシアン化カリウムを含有する水溶液を滴下し、乾燥させることにより、反応層を形成した。次に、前記反応層上に、試料液の反応層への供給をより一層円滑にするために、レシチンの有機溶媒溶液、例えばトルエン溶液を、試料液供給口12aから反応層上にわたって広げ、乾燥させることによりレシチン層を形成した。次に、基板1に、カバー10およびスペーサ11を図2中の一点鎖線で示すような位置関係をもって接着してグルコースセンサを作製した。

【0021】このセンサを測定器にセットし、対極6を基準にして第3の電極8に500mVの電位を印加した。この電位を印加した状態で、妨害物質としてアスコルビン酸を含むグルコース水溶液3 $\mu$ lを、試料液として試料液供給口12aより供給した。試料液は試料液供給路を通して空気孔13にまで達し、電極系上の反応層が溶解した。試料液の供給と同時に、電極系の対極6と第3の電極8間の電気的変化に基づいて液の供給を検知するシステムが動作し、これにより測定タイマーが始動した。この時、対極6と第3の電極8間に電位は印加され続けており、試料液供給検知から一定時間経過後に、対極6と第3の電極8間の電流値を測定した。この電流値は、妨害物質として含まれるアスコルビン酸の酸化反応に起因し、その濃度に対して比例関係を与えた。対極6と第3の電極8間の電流値測定後、両極間の電圧印加を解除した。

【0022】上述したように、第3の電極8上には反応層が配置されていない。よって、酵素反応の結果生成したフェロシアン化イオンが第3の電極8近傍に到達するまでには、若干の時間を必要とする。すなわち、フェロシアン化イオン到達までの時間内における対極6と第3の電極8間の電流値は、主にアスコルビン酸の濃度のみを反映する。さらに、試料液検知から25秒後、対極6を基準にして作用極7に500mVを印加し、対極6と作用極7間の5秒後の電流値を測定した。液中のフェリシアン化イオン、グルコース、およびGODが反応し、その結果、グルコースがグルコノラクトンに酸化され、フェリシアン化イオンがフェロシアン化イオンに還元される。このフェロシアン化イオンの濃度は、グルコース

の濃度に比例する。試料液検知から30秒後の対極6と作用極7間の電流は、フェロシアン化イオンと、あらかじめ存在するアスコルビン酸の酸化反応に起因する。すなわち、アスコルビン酸が測定結果に正の誤差を与えることとなる。しかしながら、上述したように、対極6と第3の電極8間の電流値は主にアスコルビン酸の濃度のみを反映する。そこで、その結果に基づき測定結果を補正することにより、アスコルビン酸の影響を除去し、正確なグルコース濃度を求めることができる。

【0023】本実施例では、対極6と第3の電極8間で試料液の供給を検知するため、作用極7の露出部全てが確実に試料液で満たされる。これにより、試料液の供給をより確実に判定することができる。

【0024】《実施例3》実施例2と同様にグルコースセンサを作製した。測定器にセンサをセットし、対極6を基準にして第3の電極8に500mVの電位を印加した。この電位を印加した状態で、妨害物質としてアスコルビン酸を含むグルコース水溶液3 $\mu$ lを、試料液として試料液供給口12aより供給した。試料液は試料液供給路を通して空気孔13にまで達し、電極系上の反応層が溶解した。試料液の供給と同時に、電極系の対極6と第3の電極8間の電気的変化に基づいて液の供給を検知するシステムが動作し、これにより測定タイマーが始動した。この時、対極6と第3の電極8間に電位は印加され続けており、試料液供給検知から一定時間経過後に、対極6と第3の電極8間の電流値を測定した。この電流値は、妨害物質として含まれるアスコルビン酸の酸化反応に起因し、その濃度に対して比例関係を与えた。対極6と第3の電極8間の電流値測定後、両極間の電圧印加を解除した。

【0025】上述したように、第3の電極8上には反応層が配置されていない。よって、酵素反応の結果生成したフェロシアン化イオンが第3の電極8近傍に到達するまでには、若干の時間を必要とする。すなわち、フェロシアン化イオン到達までの時間内における対極6と第3の電極8間の電流値は、主にアスコルビン酸の濃度のみを反映する。さらに、試料液検知から25秒後、第3の電極8を基準にして作用極7に500mVを印加し、対極6と作用極7間の5秒後の電流値を測定した。液中のフェリシアン化イオン、グルコース、およびGODが反応し、その結果、グルコースがグルコノラクトンに酸化され、フェリシアン化イオンがフェロシアン化イオンに還元される。このフェロシアン化イオンの濃度は、グルコースの濃度に比例する。試料液検知から30秒後の対極6と作用極7間の電流は、フェロシアン化イオンと、あらかじめ存在するアスコルビン酸の酸化反応に起因する。すなわち、アスコルビン酸が測定結果に正の誤差を与えることとなる。しかしながら、上述したように、対極6と第3の電極8間の電流値は主にアスコルビン酸の濃度のみを反映する。そこで、その結果に基づき測定結

果を補正することにより、アスコルビン酸の影響を除去し、正確なグルコース濃度を求めることができる。また、作用極 7 への電位印加時に、第 3 の電極 8 の電位を銀／塩化銀電極を基準にして測定したところ、作用極 7 において酸化反応が生じているにもかかわらず、第 3 の電極 8 における電位の変動は殆ど見られなかった。また、作用極—対極間の抵抗値変化に基づいて液絡検知を行っていた従来法に比べて、応答のばらつきが減少した。

【0026】《実施例 4》実施例 2 と同様に、第 3 の電極 8 を除く、対極 6、作用極 7 およびカーボン層 9 上に反応層を形成した。次に、試料液供給路を形成するためのカバー部材上に形成された溝部に、試料液の反応層への供給をより一層円滑にするために、レシチンの有機溶媒溶液、例えばトルエン溶液を広げ、乾燥させることによりレシチン層を形成した。次に、基板 1 に、カバー 10 およびスペーサ 11 を図 2 中の一点鎖線で示すような位置関係をもって接着してグルコースセンサを作製した。反応層上から第 3 の電極 8 上にわたってレシチン層を配置した場合、第 3 の電極 8 表面上がレシチン層により変化を来し、その応答特性のばらつきが大きくなる場合がある。上記のようにレシチン層をカバー部材側に配置すると、そのようなばらつきは抑制され、応答特性に向上が見られた。

【0027】《実施例 5》反応層から CMC 層を除去した以外は、全て実施例 2 と同様の方法でグルコースセンサを作製した。そして、実施例 2 と同様に測定を行った結果、CMC 層を配置した場合に比べて応答のばらつきは増加したものの、アスコルビン酸およびグルコースに対する濃度依存性が観察された。

【0028】《実施例 6》実施例 4 と同様にグルコースセンサを作製した。測定器にセンサをセットし、対極 6 を基準にして第 3 の電極 8 に  $-1300\text{ mV}$  の電位を印加した。この電位を印加した状態で、空気飽和状態のグルコース水溶液  $3\text{ }\mu\text{ l}$  を、試料液として試料液供給口 12 a より供給した。試料液は試料液供給路を通して空気孔 13 にまで達し、電極系上の反応層が溶解した。試料液の供給と同時に、電極系の対極 6 と第 3 の電極 8 間の電気的変化に基づいて液の供給を検知するシステムが動作し、これにより測定タイマーが始動した。この時、対極 6 と第 3 の電極 8 間に電位は印加され続けており、試料液供給検知から一定時間経過後に、対極 6 と第 3 の電極 8 間の電流値を測定した。この電流値は、溶存酸素の還元反応に起因し、アルゴンにて脱気したグルコース溶液を供給した場合には、その還元電流は激減した。対極 6 と第 3 の電極 8 間の電流値測定後、両極間の電圧印加を解除した。

【0029】上述したように、第 3 の電極 8 上には反応層が配置されていない。よって、反応層に含有するフェリシアン化イオンが第 3 の電極 8 近傍に到達するまでに

は、若干の時間を必要とする。すなわち、フェリシアン化イオンが第 3 の電極 8 に到達するまでの時間内における対極 6 と第 3 の電極 8 間の電流値は、主に溶存酸素濃度のみを反映する。さらに、試料液検知から 2.5 秒後、第 3 の電極 8 を基準にして作用極 7 に  $500\text{ mV}$  を印加し、対極 6 と作用極 7 間の 5 秒後の電流値を測定した。液中のフェリシアン化イオン、グルコース、および GOD が反応し、その結果、グルコースがグルコノラクトンに酸化され、この反応に伴って、フェリシアン化イオンがフェロシアン化イオンに還元される。一方、この反応の競争反応として、試料液中の溶存酸素が電子伝達体として働き、グルコースがグルコノラクトンに酸化されるのに伴い、溶存酸素が過酸化水素に還元される反応が同時に進行する。この反応によって生成する過酸化水素は、フェロシアン化イオンをフェリシアン化イオンに再酸化する。したがって、フェロシアン化イオンの酸化電流値に基づいてグルコース濃度を測定する場合、溶存酸素が、測定結果に負の誤差を与える。しかし、上述したように、対極 6 と第 3 の電極 8 間の電流値は主に溶存酸素濃度のみを反映する。そこで、その結果に基づき測定結果を補正することで、溶存酸素の影響を除去し正確なグルコース濃度を求めることができる。

【0030】《実施例 7》実施例 4 と同様にグルコースセンサを作製した。測定器にセンサをセットし、対極 6 を基準として第 3 の電極 8 に  $500\text{ mV}$  の電位を印加した。この電位を印加した状態で、妨害物質としてアスコルビン酸を含むグルコース水溶液  $3\text{ }\mu\text{ l}$  を、試料液として試料液供給口 12 a より供給した。試料液は試料液供給路を通して空気孔 13 にまで達し、電極系上の反応層が溶解した。試料液の供給と同時に、電極系の対極 6 と第 3 の電極 8 間の電気的変化に基づいて液の供給を検知するシステムが動作し、これにより測定タイマーが始動した。この時、対極 6 と第 3 の電極 8 間に電位は印加され続けている。さらに試料液供給検知から 2 秒経過後、第 3 の電極 8 への印加電位を  $-1300\text{ mV}$  にステップした。 $-1300\text{ mV}$  に電位をステップする直前、および  $-1300\text{ mV}$  にステップしてから 3 秒後の、二点における対極 6 と第 3 の電極 8 間の電流値を測定した。 $-1300\text{ mV}$  に電位をステップする直前の電流値は、主としてアスコルビン酸濃度に依存する。一方、 $-1300\text{ mV}$  にステップしてから 3 秒後の電流値は、主として試料液中に含まれる溶存酸素濃度に依存する。試料液供給から 2 秒後、および 5 秒後の対極 6 と第 3 の電極 8 間の電流値測定後、両極間の電圧印加を解除した。さらに試料液検知から 2.5 秒後、第 3 の電極 8 を基準にして作用極 7 に  $500\text{ mV}$  を印加し、対極 6 と作用極 7 間の 5 秒後の電流値を測定した。

【0031】上述したように、対極 6 と第 3 の電極 8 間の電流値は主にアスコルビン酸および溶存酸素濃度を反映するため、その電流値に基づき両物質の濃度を求める



ことができる。そこで、その結果に基づき測定結果を補正することで、アスコルビン酸および溶存酸素の影響を除去し、正確なグルコース濃度を求めることができる。

【0032】上記実施例においては、試料液供給検知、アスコルビン酸、あるいは溶存酸素検出のための第3の電極8への印加電位を500mV、あるいは-1300mVとしたが、これに限定されることはない。また、応答電流を得るための作用極7への印加電位を500mVとしたが、これに限定されることはなく、一連の反応の結果生じた電子伝達体の還元体を酸化できる電位であればよい。電流値を測定する時間についても、上記実施例に限定されることはない。

【0033】上記実施例においては、親水性高分子としてカルボキシメチルセルロースを用いたが、親水性高分子層を形成する親水性高分子には、種々のものを使用することができる。例えば、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルエチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリリジン等のポリアミノ酸、ポリスチレンスルホン酸、ゼラチンおよびその誘導体、ポリアクリル酸およびその塩、ポリメタアクリル酸およびその塩、スターチおよびその誘導体、無水マレイン酸またはその塩の重合体があげられる。その中でも、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースが好ましい。反応層に含有される酸化還元酵素としては、試料液に含まれる基質に応じて選択される。酸化還元酵素としては、例えば、フルクトースデヒドロゲナーゼ、グルコースオキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼなどがあげられる。電子伝達体としては、フェリシアン化カリウム、p-ベンゾキノン、フェナジンメトサルフェート、メチレンブ

ルー、フェロセン誘導体などがあげられる。電子伝達体は、これらの一種または二種以上が使用される。

【0034】上記酵素および電子伝達体は、試料液に溶解させてもよく、反応層を基板などに固定することによって試料液に溶けないようにしてもよい。酵素および電子伝達体を固定化する場合、反応層は、上記親水性高分子を含有することが好ましい。上記実施例では、特定の電極系の例を図示したが、電極形状、電極およびリードの配置等はこれらに限定されるものではない。また、上記実施例では第3の電極の電極材料としてカーボンについて述べたが、これに限定されることはなく、他の導電性材料や銀/塩化銀電極なども使用できる。

【0035】

【発明の効果】以上のように本発明によると、高い信頼性を有する基質の定量を行うことができる。

【図面の簡単な説明】

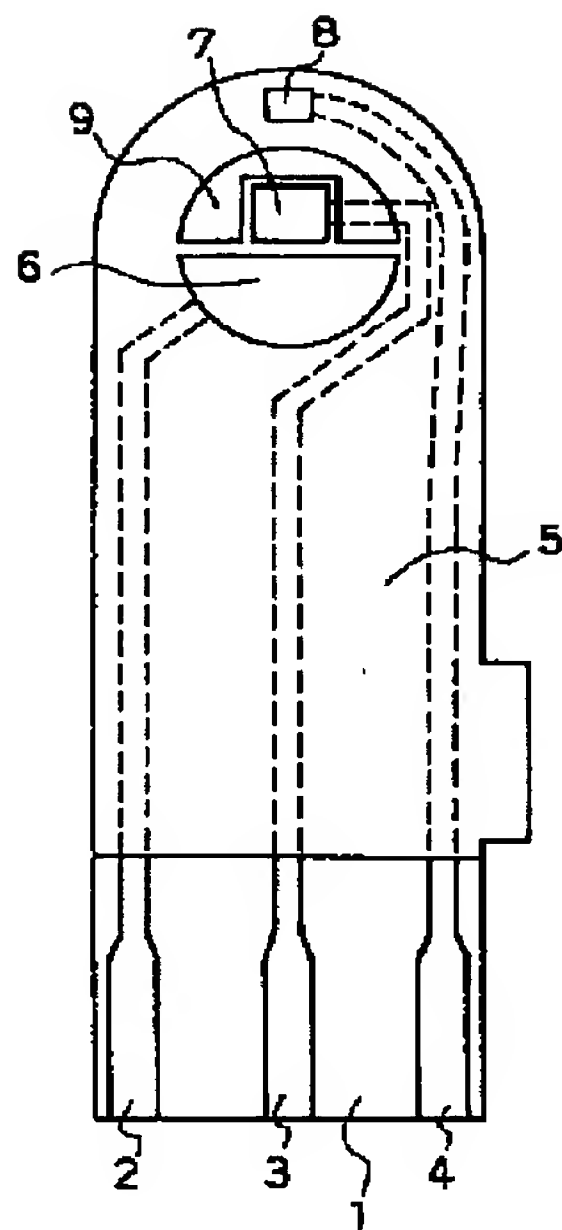
【図1】本発明の一実施例におけるグルコースセンサの反応層を除去した状態の平面図である。

【図2】本発明の他の実施例におけるグルコースセンサの反応層を除去した状態の分解斜視図である。

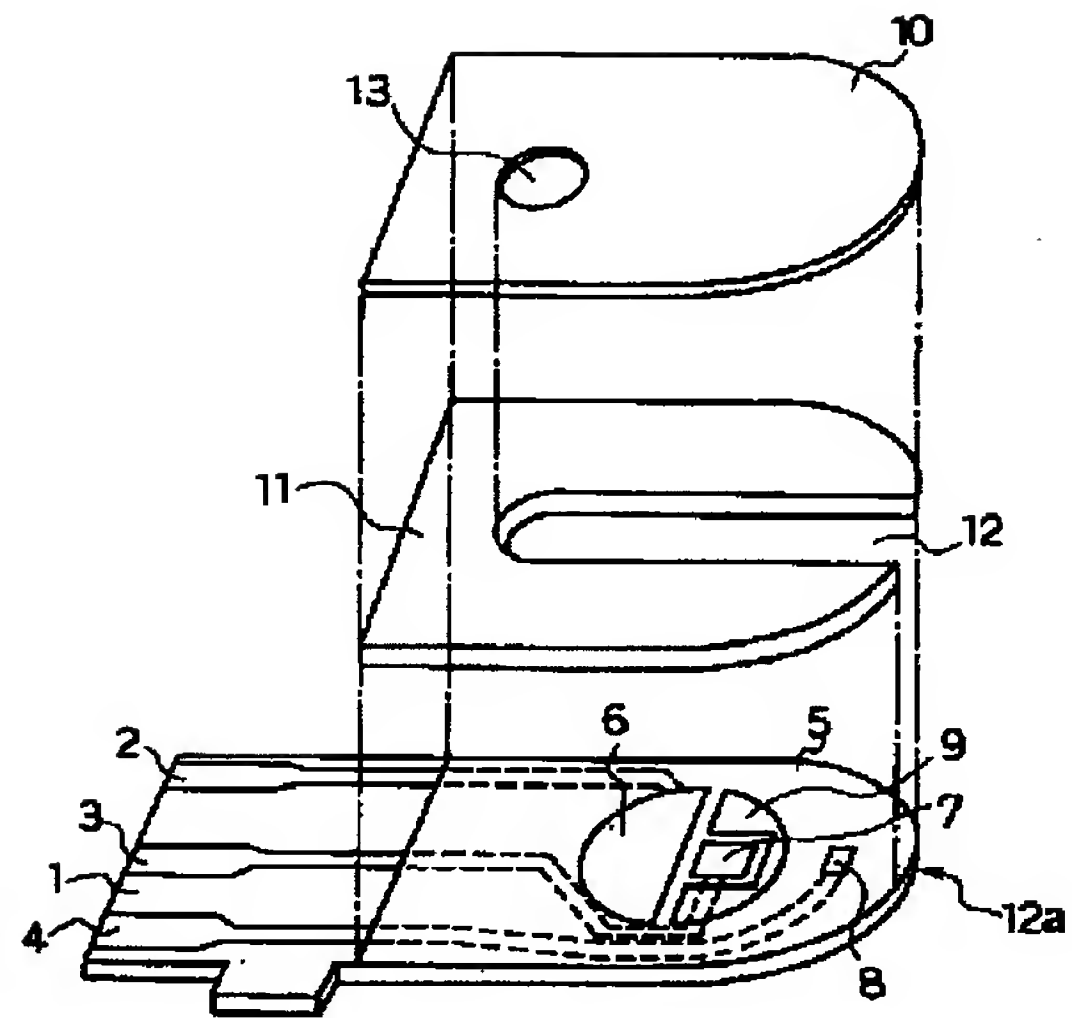
【符号の説明】

- 1 絶縁性の基板
- 2、3、4 リード
- 5 絶縁層
- 6 対極
- 7 作用極
- 8 第3の電極
- 9 カーボン層
- 10 カバー
- 11 スペーサ
- 12 試料液供給路を形成するスリット
- 12a 試料液供給口
- 13 空気孔

【図 1】



【図 2】



- 1 基板
- 6 対極
- 7 作用極
- 8 第3の電極

フロントページの続き

(56) 参考文献 特開 平 5 - 340915 ( J P , A )  
特開 平 8 - 320304 ( J P , A )

(58) 調査した分野 ( Int. Cl. <sup>7</sup> , D B 名 )  
G01N 27/327  
G01N 27/416